

瓜类枯萎病拮抗放线菌的筛选

杨 宇，吴元华，郑亚楠

(沈阳农业大学植物保护学院, 110161)

摘要: 本试验通过平板稀释法从辽宁省保护地瓜类作物根际土壤中分离出 4 株对黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumarinum* Owem) 有抑制活性的拮抗放线菌株, 采用孢子萌发法、生长速率法进行抑菌测定。结果表明: 4 菌株对黄瓜枯萎病菌孢子萌发及菌丝生长都有不同程度的抑制作用, 其抑制率在 60%~70% 左右。通过胚根接种盆栽试验结果表明: 4 菌株在田间可有效地控制黄瓜苗期枯萎病, 其中 65 号菌株防效最好, 其发酵液 10 倍液和 50 倍液的防效分别达 91.8% 和 91.4%。同时 4 种菌株代谢物质均有促进黄瓜种子萌发与幼苗根系生长的作用。

关键词: 瓜类枯萎病; 拮抗放线菌; 筛选; 生物防治
中图分类号: S432.4⁺3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2006)04-0177-03

瓜类枯萎病是瓜类作物的主要病害之一, 全国各地均有发生, 病害常年损失率在 10%~30% 左右。该病菌的厚垣孢子可以在土壤中存活 5~6a 年, 并通过土壤中存活的菌丝和厚垣孢子周而复始的进行越冬、侵染、为害、传播。由于侵染途径多样, 从侵染到发病的时间相差很大, 防治比较困难, 一旦发病很难控制, 生产上主要采取化学药剂防治。随着人们对生态农业和环境意识的提高, 化学防治的种种弊端已越来越引起人们的关注, 从微生物及其代谢产物中寻找控制病原菌的生物农药成为新农药研究的一个重要方向^[1]。迄今为止已发现有近百种微生物农药来自于放线菌的次生代谢物^[2], 其中有多抗霉素、农抗 120、武夷菌素、新生霉素、中生菌素^[3,4] 等环境友好型生物农药。本试验从辽宁省不同地区瓜类作物根部分离放线菌, 并从中筛选对致病菌有抑菌活性的菌株, 通过对筛选出的菌株进行进一步的测定与田间防效试验, 为防治瓜类枯萎病提供新的途径。

1 材料与方 法

供试土样来自辽宁省瓦房店、朝阳、丹东、锦州等 14 各地区的地瓜类作物根际土壤, 供试靶标病原菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) 分离自沈阳农业大学园艺学院、瓦房店、锦州地区保护地甜瓜、黄瓜病株。

供试分离镰刀菌培养基为 PDA 培养基, 对峙筛选试验培养基为 PSA 培养基, 分离放线菌为高氏 1 号培养基, 放线菌发酵采用玉米粉—大豆培养液培养基(大豆粉 20g、玉米粉 5g、葡萄糖 20g、碳酸钙 5g、水 1 000ml)。

1.1 土样的预处理与菌株的分离

将所采集土样分别取 10g 并分别与 1g 碳酸钙混和均匀, 放入 28℃ 的温箱中培养一周左右备用。取处理后的土样倒入 100ml 无菌水中, 置 150r/min 的摇床上震荡 20min, 静置后用移液管吸取土悬液 1ml 加 9ml 无菌水中稀释至 10⁻³~10⁻⁵ 倍, 将稀释好的土悬液同加有硫酸链霉素的 PDA 培养基充分混合后制成平板, 放入 25℃ 的温箱中培养

4~6d。将平板上的单菌落移置于高氏一号斜面中保存并编号。

1.2 拮抗放线菌株的活性测定

对峙法测定: 将尖孢镰刀菌用打孔器打出直径 6mm 的菌饼接与 PSA 培养基平板中央, 四周接 4 株放线菌, 每处理 3 次重复, 于 28℃ 下培养 6d 后测量抑菌带的大小, 记录有拮抗活性菌株的编号。

孢子萌发测定: 取初筛抑菌效果好的菌株进行摇瓶发酵。首先在无菌条件下, 用刮铲刮下放线菌孢子, 接入高氏一号培养基上涂抹均匀, 置于 28℃ 恒温培养箱中培养 5~6d, 待菌落表面颜色变深, 大部分孢子已成熟后, 刮下孢子接入装有 100ml 液体培养基的 250ml 三角瓶中, 于 28℃、150r/min 条件下振荡培养 7d 用纱布滤除菌丝体, 10 000r/min 离心 20min, 除去孢子, 取发酵滤液备用, 将发酵滤液原液、10 倍液分别同镰刀菌孢子悬浮液混合, 取于 0.2ml 滴于凹玻片上, 以未接菌的发酵滤液为对照, 保湿培养 9h, 观察记录镰刀菌孢子萌发数量及萌发情况, 计算萌发率。孢子萌发抑制率的计算公式为: 孢子萌发抑制率(%)=(对照萌发率—处理萌发率)/对照萌发率×100。

生长速率法测定: 取菌株发酵液, 用蒸馏水将待测样品稀释成不同浓度, 与定量的 PSA 培养基混合后倒入直径为 9cm 培养皿内, 制成 5 倍液、10 倍液、20 倍液、50 倍液及 100 倍液 5 个浓度的带毒培养基平板, 平板中央分别接入直径为 6mm 的镰刀菌菌饼, 每菌株重复 3 次, 以未接菌发酵液为对照, 26℃ 培养 5~6d, 用十字交叉法测量菌落增长直径, 求出菌丝生长抑制率。菌丝生长抑制率的计算公式为: 菌丝生长抑制率(%)=(对照菌落直径—处理菌落直径)/对照菌落直径×100。

1.3 优势放线菌的田间防效测定

对黄瓜种子萌发的影响: 将 4 株优势放线菌菌株 5d 发酵液滤液, 分别配制成 10、50、100 倍液待用。每处理选取饱满的山东密刺黄瓜种子 25 粒, 将配制好的上清液各取 5ml 分别装入培养皿中, 然后将黄瓜种子均匀放置于皿中, 重复 3 次, 设清水对照。置 28℃ 下保湿培养 24h 后, 记载萌发种

*基金项目: 辽宁省“十五”科技攻关重点项目(2001208001)。
收稿日期: 2006-01-23

子的主根长度, 须根数目及单株鲜重。

对黄瓜幼苗生长的影响: 每处理取山东密刺黄瓜种子 12 粒, 将 4 种供试菌株发酵滤液配制成 5 倍液浸种。24h 后取出种子在浓度为 1×10^7 个/ml 的尖孢镰刀菌孢子悬浮液中浸种 1h。将浸种后的种子取出分成 2 份, 一份播于育种钵内每钵 24 粒, 重复 3 次, 设置清水对照。待种子出苗后, 记录出苗情况, 计算出苗率。另一份播于装有灭菌营养土的花盆中, 生长 20d 后, 调查株高、叶面积、单株鲜重及病情指数, 计算相对防效。病情指数的计算公式为: 病情指数 = \sum (各级发病数 \times 该级代表数) / (总株数 \times 最高级代表值), 相对防治的计算公式为: 防治效果 (%) = (对照病情指数 - 处理病情指数) / 对照病情指数 \times 100。

2 结果与分析

2.1 活性放线菌菌株的初筛结果

通过对瓜类作物根部放线菌的分离培养, 从 20 余种土样中共分离到放线菌 134 株, 经过与尖孢镰孢菌对峙培养结果表明: 有活性的菌株可产生抗生物质抑制尖孢镰刀菌菌丝的生长, 在有活性的放线菌一侧, 镰刀菌的菌丝生长明显受到抑制, 菌丝边缘表现为停止生长或向上生长, 边缘有整齐的横截面, 抑菌活性越高的菌株抑菌带越宽, 根据抑菌带宽度筛选出 24、50、65、85、120、124、210 等 7 株优势放线菌, 占总分离菌的 4.5%。

2.2 优势放线菌株对镰孢菌菌丝生长及孢子萌发的影响

表 1 优势放线菌对尖孢镰孢菌菌落生长直径的影响 cm

菌株及浓度	24	50	65	85	120	124	210	CK
5倍	42.0	36.5	36.1	32.1	36.1	24.8	22.0	55.5
10倍	47.6	36.8	35.8	32.5	36.4	25.2	27.5	
20倍	48.6	37.0	36.5	34.8	36.7	27.8	31.5	
50倍	49.4	36.5	34.5	36.8	36.9	31.5	35.0	
100倍	55.5	36.8	36.5	37.7	37.4	34.8	37.5	

菌落增长直径越大表明镰刀菌菌丝生长旺盛, 菌落直径越小则说明放线菌的抑菌活性越高, 抑制菌丝生长的效果越好。由表 1 看出, 同一种放线菌的发酵液在培养基内的浓度越高, 菌丝生长直径越小, 抑菌活性越大, 124、210 号的抑菌活性最强, 50、65、85 号次之, 124、210 两种菌株的抑菌活性随浓度变化较明显, 其余 5 种菌株变化不明显。

表 2 优势菌株对镰孢菌孢子萌发的影响

菌株及浓度	65		85		124		210		CK
	萌发率	抑制率	萌发率	抑制率	萌发率	抑制率	萌发率	抑制率	
原液	39.2	53.3	54.5	35.1	43.2	48.6	30.8	63.3	84.0
10倍	42.3	49.6	52.2	37.9	47.9	43.0	38.8	53.8	

由表 2 看出 4 菌株发酵液对尖孢镰刀菌孢子萌发都有一定的抑制作用, 其中以 210、65 两株菌株的抑制作用最强, 原液的抑制率达到了 70% 与 61%。同时, 经过发酵液处理的病原菌孢子萌发产生的芽管都表现出不同程度的畸形, 其中 65 号菌株的孢子萌发产生的芽管短粗, 210 号菌株的孢子萌发后芽管产生膨大的球状体, 继而球状体内容物消失, 菌丝体消解。由此可见 210 菌株发酵液在抑制病原孢子萌发的同时对孢子萌发后的生长也有一定的影响。

2.3 对黄瓜种子萌发的影响

菌株 65、85、124、210 浸种结果表明: 4 菌株不同浓度处

理种子结果均好于对照, 在主根长度上除 124 的 100 倍以外, 其余各处理的主根明显增长, 以 210 的三组处理最为明显, 增长均在 10mm 以上; 在须根数量上, 各处理须根数量明显多于对照处理; 同时各个处理在单株鲜重上都有不同程度的增加。由于瓜类枯萎病菌易从幼苗根部侵染, 而后系统发病, 放线菌发酵液促进了幼苗根部的生长发育, 从而提高了幼苗抵抗病原菌侵染的能力。试验结果表明: 4 种活性放线菌菌株发酵液对黄瓜种子萌发均有促进作用, 所试浓度对种子萌发没有不良影响。

表 3 优势菌株浸种对黄瓜种子萌发的影响

菌株	浓度	主根长度(mm)	须根数量(个)	须根长度(mm)	单株鲜重(g)	平均增重(g)
65	10倍	35.3	11.4	3.3	0.09	0.00
	50倍	33.6	11.7	1.6	0.13	0.04
	100倍	38.4	14.5	6.4	0.10	0.01
85	10倍	33.7	12.3	1.7	0.12	0.03
	50倍	42.3	16.4	10.3	0.17	0.08
	100倍	33.0	10.6	1.0	0.11	0.02
124	10倍	35.9	11.5	3.9	0.14	0.05
	50倍	35.7	11.3	3.7	0.10	0.01
	100倍	31.9	10.4	-0.1	0.17	0.08
210	10倍	48.1	17.3	16.1	0.11	0.02
	50倍	42.0	12.1	10.0	0.12	0.03
	100倍	42.1	11.4	10.1	0.12	0.03
CK	清水	32.0	9.2	0	0.09	-

2.4 对黄瓜幼苗生长及枯萎病防治效果的影响

表 4 优势菌株发酵液对黄瓜幼苗生长及枯萎病防治效果的影响

菌株	浓度	出苗率(%)	株高(mm)	叶面积(cm ²)	单株鲜重(g)	病情指数	相对防效(%)
210	10倍	85.7	53.2	63.9	4.3	14.3	71.4
	50倍	81.0	52.0	57.6	3.4	16.7	66.6
124	10倍	76.0	57.8	62.2	4.7	10.6	78.8
	50倍	82.1	52.8	57.9	3.9	13.0	74.0
85	10倍	90.5	50.4	60.1	3.8	11.9	76.2
	50倍	81.8	47.8	49.4	3.2	13.1	73.8
65	10倍	92.3	56.2	57.4	3.8	4.1	91.8
	50倍	92.0	54.4	53.8	3.6	4.3	91.4
CK		48.0	39.2	43.1	3.0	50.0	

由表结果看出, 4 株菌株发酵滤液不同浓度处理后的种子的出苗情况都明显好于对照处理, 死苗率低, 幼苗长势健壮, 其中以 65 号菌株处理的出苗情况最好, 出苗率达 92.0% 和 92.3%; 在生长状况上也有显著差异, 4 种菌株处理的幼苗在株高、叶面积、单株鲜重上都明显高于对照处理。其中 124、65 号菌株的株高略高于其他处理, 210、65 号菌株的叶面积略大, 124 号菌株的单株鲜重最重, 整体以 210、65 号菌株最好, 植株长势旺盛, 根茎粗壮, 叶色浓绿; 在防治效果上各处理的病情指数明显低于对照处理, 对苗期枯萎病均具有较高的防治效果, 以 65 号菌株处理在病情指数最低, 两个浓度处理的相对防效分别达 91.8% 和 91.4%。

3 结论与讨论

本研究从黄瓜根部分离出放线菌 134 株, 其中对尖孢镰刀菌有抑制活性的菌株 7 株, 占总分离菌株的 4.5%。经过对 4 株优势菌株采用浸种与灌根的方法进行田间药效测定表明, 4 种菌株均显示出了较好的抑菌和促进植株生长作用。由于瓜类枯萎病是一类幼苗侵染的病害, 植株在苗期的生长状况直接影响其对病害的抵抗能力。通过试验, 4 株放

寒冷地区梨树干枯病及防治

丁丽华, 赵晨辉, 邹利人

(吉林省农业科学院果树所, 公主岭 136100)

中图分类号: S436. 612. 1⁺ 5 文献标识码: B
文章编号: 1001- 0009(2006)04- 0179- 01

梨树干枯病又称干腐病, 是一种危害梨树苗木和枝干的真菌病害。病源为 *Phomopsis fukushii* Tanaka et Endo. 寄主为中国梨和日本梨, 如秋子梨、白梨、沙梨等, 是寒冷地区梨园经常发生的一种常见病害。严重影响梨苗生长和造成成龄梨树大量死枝或死树。因此, 必须加强预防才能使梨树安全丰产。

1 主要症状

1.1 病苗

初发病在茎基部表面出现圆形暗色水渍状斑点; 后扩展成椭圆形、棱形或不规则形状红褐色病斑; 以后病斑逐渐凹陷, 病健交界处产生裂缝, 并在病斑表面密生黑色小粒点。再后变黑干缩。随着褐色病斑的侵害加深病斑围茎 1/2 以上时, 因梨树苗水分和营养输送受到阻碍而上部逐渐萎蔫干枯变黑死亡, 刮风时易折断。

1.2 成龄树多在枝干上发病

症状与幼树苗发病相似。严重时病部凹陷、干裂、翘起, 露出木质部, 后期在病树皮表面上出现散生的细小黑色点粒状突起—即孢子器。严重时引起死枝死树。

2 病害侵染过程

2.1 病害的潜伏寄生体

梨树干枯病的病菌, 以多年生菌丝体或分生孢子器、分生孢子、子囊壳在被害部位皮层中寄生越冬。

2.2 病原体的成长

越冬后, 随着春天温度的提高, 春雨的滋润, 在温湿度条件适宜的情况下菌丝蔓延或分生孢子器散发孢子。

2.3 病害侵染过程

每年5~6月随着雨季的来临, 菌丝或孢子借助风雨的传播, 引起初次侵染。苗木(包括山梨苗)和幼树受害比较明显, 6月份蔓延速度加快。成龄树一般是从修剪和其他的机械伤口侵入, 生长势衰弱的树发生较重。

3 发病条件

3.1 温、湿度

5月份阴雨多湿, 有利孢子放散和侵染; 5月下旬至6月份的阴雨多湿有利于病斑扩展; 6月下旬以后的高湿抑制病势的发展。

3.2 栽培条件

土壤瘠薄或保水保肥能力差的沙砾多的地块容易发病, 土壤有机质多、肥力好, 通透性好的土壤发病较轻; 地势低洼, 排水不良的地块容易发病, 地势较高, 通风排水好的地块发病较轻; 长势弱的树发病较重, 健壮树不易发病。

4 防治方法

4.1 药剂防治

4.1.1 春季剪砧抽梢后, 喷药保护, 预防初侵染。药剂及使用如下: 早春剪5度石硫合剂一次; 在苗木生长期, 喷1:2:200(倍液式)波尔多液, 10~15d一次, 共两次; 50%退菌特800倍液7~10d一次, 共2~3次。70%甲基托布津1000~1200倍液10d一次, 共2~3次; 多菌灵、百菌清等亦可用于防治。已发病的苗木, 应于发病初期刮除病斑, 并用托布津油膏涂抹病部, 或涂S-921抗菌剂20~30倍液或2%的401抗菌剂。也可不刮除病斑, 用刀将病斑纵向划条, 然后涂抹401抗菌剂20倍液。

4.1.2 幼树及成龄树防治 可于萌芽前喷布5°Be石硫合剂; 萌芽后喷布0.5°Be石硫合剂; 也可参照上述方法防治。但是, 应事先检查, 刮除病患部后再行施药。

4.2 人工防治

梨干枯病主要为害10a以下枝条苗木, 所以防治重点是在苗圃和幼树。

4.2.1 苗木检验 梨干枯病可以通过苗木传播, 所以调运的苗木必须经过检验。

4.2.2 合理选用苗圃地, 选择地势高、通风和光照条件好的岗地作梨苗圃, 从源头防御病害。

4.2.3 加强栽培管理, 增强树势, 提高树体的抗病力。

4.2.4 加强树体保护, 减少伤口。对修剪后的大伤口, 及时涂抹油漆或动物油, 以防止伤口水分散发过快而影响愈合, 预防病菌侵入。

4.2.5 及时清除病苗、病枝和病疤, 烧毁, 尽量减少病源。

4.2.6 低洼地注意开沟排水和降低地下水位; 粘重的地块要注意增强施有机肥, 压绿肥, 或掺沙改良根系生态环境; 窝风的地块应注意通风。

4.2.7 苗圃地萌芽抽梢后, 除注意喷药(见前述)预防侵染外, 还要经常检查苗木新梢的根茎部位, 发现病疤、病苗及时剪除病部, 而后再施药消毒保护。

4.2.8 已定植的幼树和成龄树, 5~6月应经常检查, 发现病患及时清除侵染的部位或剪断患病枝条。

收稿日期: 2006- 02- 27

线菌的发酵液不仅具有抑菌作用, 还在不同程度上促进了植株的生长发育, 尤其在胚根接种试验中, 4种菌株均表现出了很高的促根作用。

在4菌株中, 以210、65两株菌株的各项结果较好。虽然65号菌株的离体抑菌活性小于210号菌株, 但它在田间试验中表现出了很好的防治效果。由于一部分抗生素类生物农药具有很好的内吸作用, 能在作物体内传导, 更好的抑制病原真菌孢子萌发、芽管生长以达到防治病害的目的。65号菌株较210号菌株也可能具有更好的内吸性, 或者该发酵液能诱导黄瓜产生了对枯萎病菌的抗性, 有待于通过对其防病机理的进一步深入研究来加以揭示。

同化学农药相比, 防效一直是制约生物农药发展的瓶

颈, 本次试验所筛选出的210、65两种菌株显示了良好的生防活性及较高的田间防效, 由于试验时间、条件的限制, 研究还只是刚刚开始, 若要将其用于大面积田间防治还有许多抑菌机理、菌株改造、药效稳定性等方面的研究需要进行。

参考文献:

[1] 刘训理, 崔云龙, 张国珍, 等. S-921 抗生素中部分理化性质研究[J]. 山东农业大学学报, 1995, 26(2): 199- 204.
[2] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975.
[3] 阮继生, 刘志恒, 宋丽儒, 等. 放线菌研究及应用[J]. 北京: 科学出版社, 1990.
[4] 阎逊初, 芦运玉, 邓宇秀, 等. 微生物学报[J], 1962 8(4): 391- 401.